

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06015

研究課題名(和文)カンキツ果実における -クリプトキサントフィルのエステル化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the esterification mechanism of beta-cryptoxanthin in citrus fruit

研究代表者

張 嵐翠 (Zhang, Lancui)

静岡大学・農学部・特任助教

研究者番号：20767371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カンキツ果実におけるキサントフィルのエステル化機構を解明するために、果実におけるキサントフィルエステルの含量の季節変動を調査した。その結果、果実の成熟に伴いキサントフィルエステルの含量が増大し、成熟した果実には85%以上がエステル体として存在していた。また、マイクロアレイ解析を用いて、キサントフィルのエステル化に関わる遺伝子を探索した。CitXES1, CitXES6, CitXES7, CitXES8およびCitXES9の発現レベルはエステル体含量の季節変動と似たような発現を示した。よって、これらの遺伝子はカンキツ果実においてキサントフィルのエステル化に関わる遺伝子であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題で取り組む -クリプトキサントフィルの脂肪酸とのエステル化は、 -クリプトキサントフィルの高蓄積メカニズムに大きく関わっていることが予想される。本研究では、カンキツ果実における新たな -クリプトキサントフィルの高蓄積機構を解明し、研究成果は機能性成分である -クリプトキサントフィルの高含有化栽培技術、貯蔵技術、高含有新品種の育種へ繋がる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to elucidate the mechanism of the xanthophyll esterification in citrus fruit, the changes in the contents of xanthophyll esters were investigated in the flavedo and juice sacs of different citrus varieties during the ripening process. The results showed that the contents of xanthophyll esters increased gradually in citrus fruit during the ripening process, and more than 85% of xanthophylls were present in esterified forms in the mature fruit. In addition, we screened the genes involved in xanthophyll esterification by microarray analysis. The results showed that the expression of CitXES1, CitXES6, CitXES7, CitXES8, and CitXES9 increased rapidly in the citrus fruit during the ripening process. The changes in the expression of CitXESs were well consistent with the accumulation of xanthophyll esters during the ripening process, which indicated that CitXESs might be the key genes responsible for xanthophyll esterification in citrus fruit.

研究分野：収穫後生理学

キーワード： -クリプトキサントフィル キサントフィル エステル化

## 様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カンキツ果実は、総カロテノイドのうち 90%以上をキサントフィルが占めており、キサントフィルの中でも  $\beta$ -クリプトキサンチンおよびビオラキサンチンを主要なカロテノイドとして蓄積する。特に、 $\beta$ -クリプトキサンチンはウンシュウミカンに多く蓄積するキサントフィルであり、ヒト体内においてビタミン A の前駆体または抗酸化物質として作用する。また、最近の疫学研究から  $\beta$ -クリプトキサンチンは、肺がん、骨粗鬆症、2 型糖尿病等の生活習慣病の予防が期待される機能性成分であることが報告されている。

これまで研究代表者のグループは、ウンシュウミカン果実の成熟に伴い、 $\beta$ -クリプトキサンチンのエステル体の含量が増大し、成熟したカンキツ果実に含まれる  $\beta$ -クリプトキサンチンの 90%以上がエステル体として存在することを明らかにした。また、 $\beta$ -クリプトキサンチンは、脂肪酸のラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸とエステル化していることを明らかにした ( 図

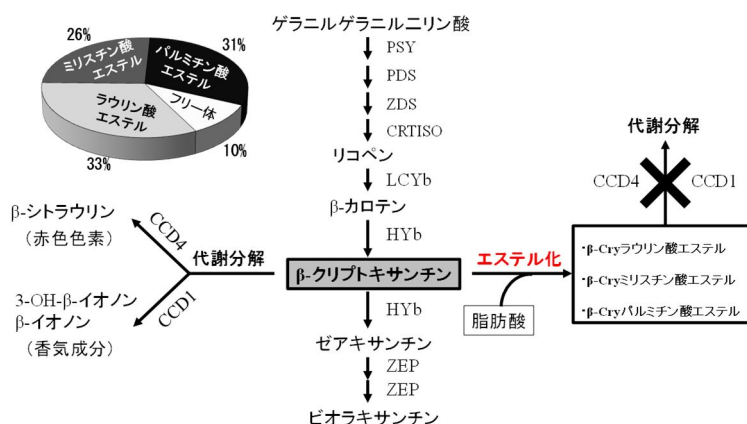


図1 カンキツにおける $\beta$ -クリプトキサンチン ( $\beta$ -Cry) の蓄積および代謝分解経路

1)。さらに、図1のように、エステル化していないフリー体の $\beta$ -クリプトキサンチンは、カロテノイド酸化開裂酵素 (CCD1 および CCD4) により分解されたが、3種類の $\beta$ -クリプトキサンチンエステルは CCD1 または CCD4 によって分解されなかった。これらの結果から、脂肪酸による $\beta$ -クリプトキサンチンのエステル化は、 $\beta$ -クリプトキサンチンがカンキツ果実中に安定して高蓄積するために必要なメカニズムであると考えられた。

近年、キサントフィルをエステル化する酵素として、アシルトランスフェラーゼ (DGAT, LPAT) または GDSL エステラーゼ/リパーゼ遺伝子が単離されている。トマトでは、シロイヌナズナのフィチル脂肪酸エステル合成酵素 (Phytyl fatty acid ester synthase: PES) のホモログである PYP1 が DGAT 活性を有し、雌ずいや花弁のキサントフィルのエステル化に関与することが報告された (Ariizumi et al., 2014)。一方、コムギにおいて、GDSL エステラーゼ/リパーゼ遺伝子である XES (Xanthophyll esterase) が単離された (Watkins et al., 2019)。XES は TAG を最適な基質として、キサントフィルであるルテイン、ゼアキサンチンおよび  $\beta$ -クリプトキサンチンのエステル化に関わる重要な遺伝子であると報告された。

### 2. 研究の目的

これまで、他の植物種においてキサントフィルのエステル化に関わる酵素について研究されているが、カンキツ果実における  $\beta$ -クリプトキサンチンのエステル化に関わる研究はこれまで行われていない。また、 $\beta$ -クリプトキサンチンをエステル化する酵素遺伝子は単離されていない。本研究では、カンキツ果実における  $\beta$ -クリプトキサンチンのエステル化に関与する酵素遺伝子の単離、発現解析、機能解析を行うことにより、カンキツ果実における  $\beta$ -クリプトキサンチンのエステル化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、キサントフィルを多く蓄積するウンシュウミカンの‘宮川早生’ (*Citrus unshiu* Marcow.) およびパレンシアオレンジ (*Citrus sinensis* Osbeck) を用いて、カンキツ果実における  $\beta$ -クリプトキサントフェールのエステル化メカニズムを明らかにするために、次の実験を行った。

#### (1) マイクロアレイを用いた *CitXESs* の単離および発現解析

ウンシュウミカン‘宮川早生’の9月、10月および12月の果皮から、RNAを抽出し、農研機構果樹茶業研が設計した8×60Kカスタムマイクロアレイ (Agilent Technologies 社製) を用いてマイクロアレイ解析を行った。このマイクロアレイには、クレメンティンの全ゲノム配列から予想された33,929遺伝子のうち、プローブ設計が可能な30,826遺伝子に由来するプローブが搭載されている。遺伝子発現データの解析にはSubioソフトを用いた。

#### (2) カンキツ果実におけるフリー体およびエステル体キサントフィル含量の季節変動の調査

ウンシュウミカンおよびパレンシアオレンジの9月、10月、11月、12月における果皮および果肉について、2通りの方法でキサントフィル含量を定量した。抽出溶媒を用いてキサントフィルを抽出後、一方はKOHでけん化して全てフリー体としてHPLCにより定量し、もう一方はけん化せずにHPLCにより定量して、その含量の差をエステル体含量として算出した。

#### (3) カンキツ果実におけるキサントフィルのエステル化に関わる遺伝子 (*CitXESs*) 発現の季節変動の調査

ウンシュウミカンおよびパレンシアオレンジの9月、10月、11月、12月におけるキサントフィルのエステル化に関わる遺伝子 *CitXESs* の発現をリアルタイムPCRによって測定した。果皮および果肉のサンプルからRNAを抽出し、カラムによる精製、DNase処理後、一本鎖cDNAを鋳型に、TaqManプローブおよびプライマーを用いたリアルタイムPCRにより遺伝子の発現を測定した。

#### (4) キサントフィルのエステル化に関わる遺伝子 (*CitXESs*) の単離および機能解析

*CitXES* 遺伝子の翻訳領域をp-Cold-GST発現ベクターにライゲートし、大腸菌に導入してGST融合タンパク質として組換え体の *CitXES* を発現させ、精製した。得られたリコンビナントタンパク質を用いて、キサントフィルのエステル化に関わる遺伝子 (*CitXESs*) の機能解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) マイクロアレイを用いた *CitXESs* の単離

マイクロアレイ解析ソフト Subio (Subio 社) を用いて diacylglycerol acyltransferase (DGAT) にアノテーションされた19遺伝子、lysophosphatidyl acyltransferase (LPAT) にアノテーションされた7遺伝子、GDSLエステラーゼ/リパーゼ (GDSL) にアノテーションされた86遺伝子の計112遺伝子を抽出した。その中には、クロロプラストに局在すると予想された遺伝子はDGATで6個、LPATで1個、GDSLで18個確認された。その中から、成熟に伴い発現レベルが上昇する遺伝子をDGATから3つ、LPATから1つ、GDSLから5つ選抜し、それらを *CitXES1*, *CitXES2*, *CitXES3*, *CitXES4*, *CitXES5*, *CitXES6*, *CitXES7*, *CitXES8* および *CitXES9* とした。

#### (2) *CitXESs* の系統学的分析

オンラインツール Phylogeny fr ( [http://www.phylogeny.fr/simple\\_phylogeny.cgi](http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi) ) を使用し、推定される *CitXESs* のアミノ酸配列およびトマト XES とそのホモログ ( トウガラシ, シロイヌナズナ ), コムギ XES とそのホモログ ( トマト, シロイヌナズナ, トウモロコシ ) から系統樹を作成した ( 図 2 )。系統樹分析の結果, 2 つの大きなクラスターが確認された。1 つはアシルトランスフェラーゼで, *CitXES1*, *CitXES6*, *CitXES7* および *CitXES8* が分類された。もう一方は GDSL ( SGNH ) エステラーゼ/リパーゼで, *CitXES2*, *CitXES3*, *CitXES4*, *CitXES5* および *CitXES9* が分類された。

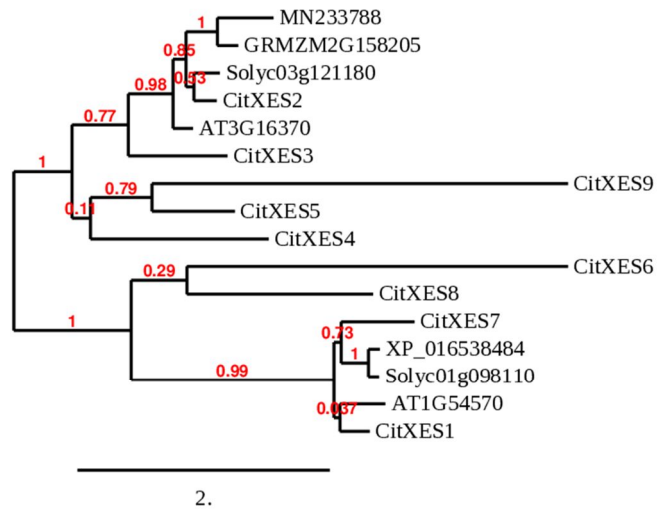


図2 *CitXESs* とほかの植物種の XES のアミノ酸配列における系統樹  
 MN233788: コムギ XAT (*Triticum aestivum*)  
 GRMZM2G158205: トウモロコシ XAT (*Zea mays*)  
 Solyc03g121180: トマト XAT (*Solanum lycopersicum*)  
 AT3G16370: シロイヌナズナ XAT (*Arabidopsis thaliana*)  
 XP\_016538484: トウガラシ PYP1 (*Capsicum annuum*)  
 Solyc01g098110: トマト PYP1 (*Solanum lycopersicum*)  
 AT3G16370: シロイヌナズナ PYP1 (*Arabidopsis thaliana*)

さらに, NCBI を使用して推定される *CitXESs* のアミノ酸配列から, 予想されるタンパク質の保存ドメインを検索した。*CitXES1*, *CitXES6*, *CitXES7* および *CitXES8* は, アシルトランスフェラーゼである LPAT ドメインが保存されていた。*CitXES2*, *CitXES3*, *CitXES4*, *CitXES5* および *CitXES9* は, GDSL ( SGNH ) エステラーゼ/リパーゼドメインが保存されていた。トマト XES も同様にタンパク質の保存ドメインを検索したところ, アシルトランスフェラーゼである LPAT ドメインが保存されていた。コムギ XES には, GDSL ( SGNH ) エステラーゼ/リパーゼドメインが保存されていた。

### ( 3 ) ウンシュウミカンとパレンシアオレンジのフリー体およびエステル体キサントフィル含量の季節変動

本研究では, キサントフィルとして All-*trans*-ピオラキサンチン, 9-*cis*-ピオラキサンチン,  $\beta$ -クリプトキサンチンおよびルテインが検出された。キサントフィルについて, フリー体のキサントフィルとエステル体のキサントフィルで区別して考えると, 両品種の果皮において, 9 月の時点ではフリー体が主に蓄積しており, 12 月では主にエステル体が蓄積していた ( 図 3 )。成熟に伴いフリー体のキサントフィル含量は減少し, エステル体のキサントフィル含量は増大した。一方, 果肉では両品種とも 9 月の時点でエステル体が蓄積しており, その含量は成熟に伴い増大した ( 図 3 )。

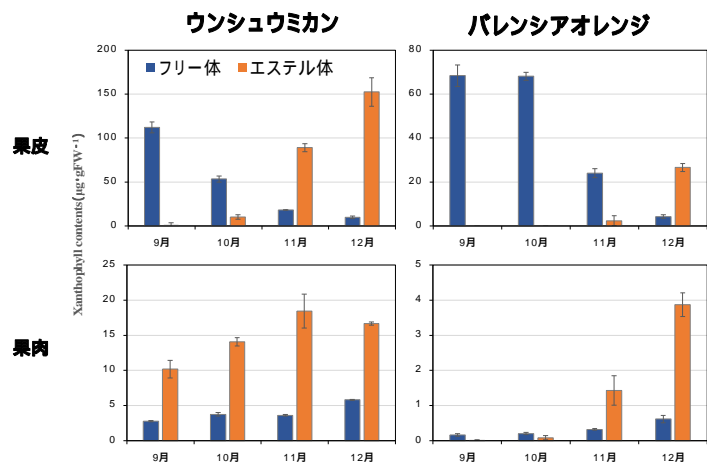


図3 ウンシュウミカンおよびパレンシアオレンジの果皮および果肉における総キサントフィル含量の季節変動

$\beta$ -クリプトキサンチンについて, 両品種の果皮および果肉において, 成熟に伴いフリー体お

よびエステル体の  $\beta$ -クリプトキサンチン含量は増大した(図4)。特に、エステル体の含量は11月から成熟に伴い急激に増大した。ウンシュウミカンの果肉においては9月の時点でもエステル体の蓄積が認められた(図4)。また、パレンシアオレンジと比較してウンシュウミカンでは果皮および果肉において、多量の  $\beta$ -クリプトキサンチンが蓄積していた。

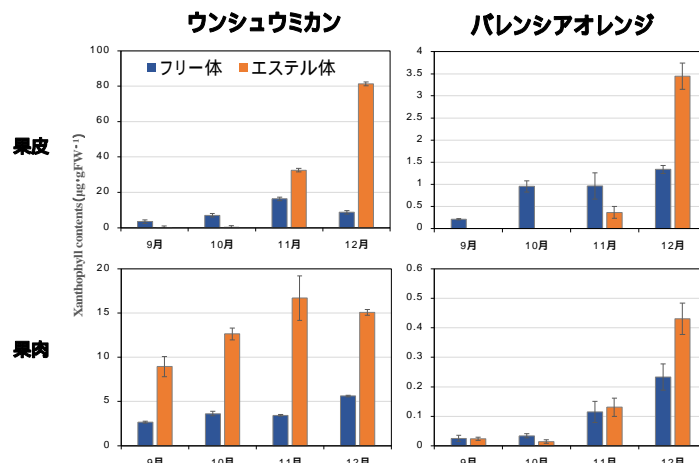


図4 ウンシュウミカンおよびパレンシアオレンジの果皮および果肉における  $\beta$ -クリプトキサンチン含量の季節変動

#### (4) リアルタイム PCR によるカンキツ 2 品種における *CitXESs* 発現の季節変動

*CitXESs* の発現解析を行ったところ、*CitXES1*、*CitXES6*、*CitXES7*、*CitXES8* および *CitXES9* の発現レベルは、

両品種の果皮と果肉において成熟に伴い上昇し、エステル体含量の季節変動と似たような発現パターンを示した(図5)。これらのことから、*CitXES1*、

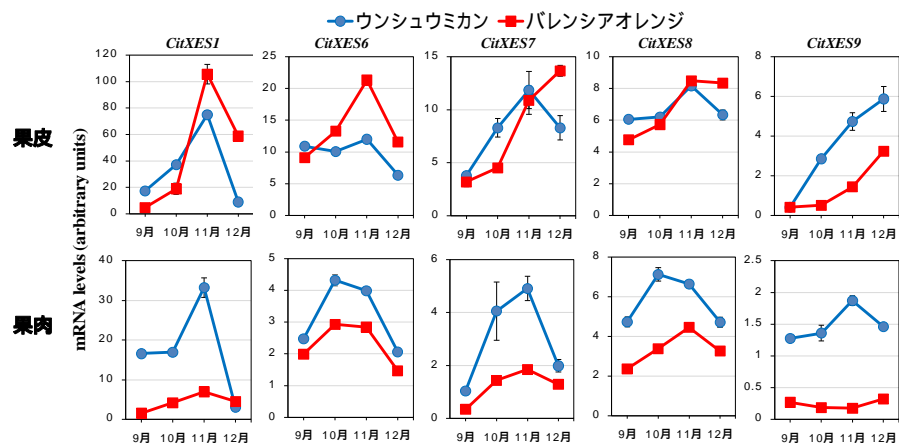


図5 ウンシュウミカンおよびパレンシアオレンジの果皮と果肉における *CitXESs* 発現の季節変動

*CitXES6*、*CitXES7*、*CitXES8* および *CitXES9* は、カンキツの果皮および果肉において、キサントフィルのエステル化に関わる遺伝子であると考えられた。

#### (5) *CitXES* の機能解析

本研究では、pCold-GST ベクターを用いて *CitXES1* のリコンビナントタンパク質を得て、*in vitro* における機能解析をしようと試みた。SDS-PAGE 分析の結果、目的遺伝子の推定分子量と一致するシングルバンドが確認された。しかし、精製した *CitXES1* のリコンビナントタンパク質と基質をインキュベートし、HPLC 分析したところ、新たなエステル体のピークは検出されなかった。今後は最適な基質や反応系の再検討が課題である。また、*CitXES1* 以外の *CitXESs* の機能解析も行っていきたい。

#### < 引用文献 >

Ariizumi T., Kishimoto S., Kakami R., Maoka T., Hirakawa H., Suzuki Y., Ozeki Y., Shirasawa K., Bernillon S., Okabe Y., Moing A., Asamizu E., Rothan C., Ohmiya A., Ezura H. Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as an essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). Plant J., 79, 2014, 453-465.

Watkins, J.L., Li, M., McQuinn, R.P., Chan, K.X., McFarlane, H.E., Ermakova, M., Furbank, R.T., Mares, D., Dong, C.M., Chalmers, K.J., et al. A GDSL esterase/lipase catalyzes the esterification of lutein in bread wheat. Plant Cell, 31, 2019, 3092-3112.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nichapat Keawmanee, Gang Ma, Lancui Zhang, Masaki Yahata, Kan Murakami, Masashi Yamamoto, Nami Kojima, Masaya Kato	4. 巻 173
2. 論文標題 Exogenous gibberellin induced regreening through the regulation of chlorophyll and carotenoid metabolism in Valencia oranges	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 14-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plaphy.2022.01.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gang Ma, Lancui Zhang, Rin Kudaka, Hayato Inaba, Murakami Kan, Yamamoto Masashi, Kojima Nami, Masaki Yahata, Hikaru Matsumoto, Masaya Kato	4. 巻 181
2. 論文標題 Auxin induced carotenoid accumulation in GA and PDJ-treated citrus fruit after harvest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Postharvest Biology and Technology	6. 最初と最後の頁 111676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.postharvbio.2021.111676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gang Ma, Lancui Zhang, Masaki Yahata, Kazuki Yamawaki, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Tomoko Endo, Masaya Kato.	4. 巻 1337
2. 論文標題 Microarray analysis of carotenoid and chlorophyll biosynthetic gene expression in the citrus juice sacs irradiated with blue light	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 195-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/ActaHortic.2022.1337.26	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miki Kato, Kohei Iida, Gang Ma, Lancui Zhang, Masaki Yahata and Masaya Kato	4. 巻 1336
2. 論文標題 Accumulation of -citraurin and expression of carotenoid cleavage dioxygenase4 gene in citrus fruit during maturation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 61-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/ActaHortic.2022.1336.9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Masashi Yamamoto, Gang Ma, Lancui Zhang, Masaki Yahata, Terutaka Yoshioka, Masaya Kato
2. 発表標題 Characterization of -cryptoxanthin esters accumulation and carotenoid biosynthetic genes expression during citrus fruit maturation
3. 学会等名 V Asia Symposium on Quality Management in Postharvest Systems (ISHS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gang Ma, Lancui Zhang, Masaki Yahata, Kazuki Yamawaki, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Tomoko Endo, Masaya Kato
2. 発表標題 Microarray analysis of carotenoid and chlorophyll biosynthetic gene expression in the citrus juice sacs irradiated with blue light
3. 学会等名 IX International Symposium on Light in Horticulture (ISHS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nichapat Keawmanee, Gang Ma, Lancui Zhang, Masaki Yahata, Masaya Kato
2. 発表標題 Characterization of Pigments Accumulation in Valencia Orange During Regreening
3. 学会等名 V Asia Symposium on Quality Management in Postharvest Systems (ISHS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miki Kato, Gang Ma, Lancui Zhang, Masaki Yahata, Masaya Kato
2. 発表標題 Accumulation of -citraurin and expression of carotenoid cleavage dioxygenase4 gene in citrus fruit during maturation
3. 学会等名 V Asia Symposium on Quality Management in Postharvest Systems (ISHS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenta Nomura, Hayato Inaba, Gang Ma, Lancui Zhang, Masaki Yahata, Hikaru Matsumoto, Masaya Kato
2. 発表標題 Effects of phytohormones on coloration of Satsuma mandarin fruit during long-term storage
3. 学会等名 V Asia Symposium on Quality Management in Postharvest Systems (ISHS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kan Murakami, Gang Ma, Lancui Zhang, Masaki Yahata, Hikaru Matsumoto, Masaya Kato
2. 発表標題 Effects of auxin and 1-MCP on carotenoid and chlorophyll metabolisms in postharvest Satsuma Mandarin fruit
3. 学会等名 V Asia Symposium on Quality Management in Postharvest Systems (ISHS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本将士, 馬 剛, 張嵐翠, 八幡昌紀, 島田武彦, 藤井浩, 遠藤朋子, 加藤雅也
2. 発表標題 カンキツ果実におけるキサントフィルのエステル体含量の季節変動および関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 望月春奈, 馬 剛, 張嵐翠, 八幡昌紀, 加藤雅也
2. 発表標題 培養した '太田ボンカン' のフラベドにおけるカロテノイド, クロロフィルおよびジベレリン代謝に及ぼすジベレリンの影響
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 加藤美紀, 馬 剛, 張嵐翠, 八幡昌紀, 加藤雅也
2. 発表標題 '山下紅早生'における -Citraurin代謝に関わるCarotenoid cleavage dioxygenase (CCD) 遺伝子の発現および機能解析
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池谷将斗, 野村健太, 馬 剛, 張嵐翠, 八幡昌紀, 加藤雅也
2. 発表標題 ウミカン果実における着色に及ぼすサリチル酸およびジャスモン酸の影響
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村陽, 馬 剛, 張嵐翠, 八幡昌紀, 山脇和樹, 竹内純, 轟泰司, 加藤 雅也
2. 発表標題 カンキツの培養したフラベドにおけるカロテノイド集積に及ぼすアブシジン酸受容体阻害剤の影響
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北谷友梨佳, 望月春奈, 馬 剛, 張嵐翠, 八幡昌紀, 山 脇和樹, 松本光, 加藤 雅也
2. 発表標題 '太田ポンカン'のフラベドにおけるカロテノイドおよびクロロフィル代謝に及ぼす植物ホルモンの影響
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月春奈, 北谷友梨佳, 馬 剛, 張嵐翠, 八幡昌紀, 山脇和樹, 加藤雅也
2. 発表標題 パレンシアオレンジのフラベドにおけるカロテノイドおよびクロロフィル代謝に及ぼす植物ホルモンの影響
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本将士, 馬 剛, 張嵐翠, 八幡昌紀, 山脇和樹, 吉岡照高, 太田智, 加藤雅也
2. 発表標題 カンキツ果実におけるキサントフィルのエステル化に関わる酵素遺伝子の探索
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 加藤 雅也, 馬剛, 張嵐翠 ( 編集: 山内 直樹, 今堀 義洋)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 312
3. 書名 園芸利用学 ( 第3章、 第12章 分担)	

1. 著者名 Gang Ma, Lancui Zhang, Minoru Sugiura, Masaya Kato	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 538頁
3. 書名 The Genus Citrus (Co-editors Manuel Talon, Marco Caruso, Fred Gmitter). Chapter 24: Citrus and Health, 495-511頁	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------